

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32407

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570181

研究課題名(和文)アクチンゲルの振動メカニズムの解明

研究課題名(英文)Study of autonomous oscillation in PEG-crosslinked actin hydrogel

研究代表者

佐野 健一 (SANO, Ken-Ichi)

日本工業大学・工学部・准教授

研究者番号：80321769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：アクチンフィラメント間をPEG鎖で化学架橋したアクチンゲルの貯蔵弾性率、つまり硬さが自励振動することを明らかにした。この自励振動の源は、化学架橋とアクチンの脱重合・重合ダイナミクス、つまりアクチンの協調的・同調的な重合・脱重合現象、ダイナミックインスタビリティ(動的不安定性)と呼ばれる現象に起因することを示した。本研究では、動的粘弾性とアクチンの重合を同時観察する実験システムを構築し、ダイナミックインスタビリティに基づいたゲルモデルの作製および、運動抽出システムの構築を進めた。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in synthesizing chemically poly-ethylene glycol cross-linked hydrogels comprised of actin. We have found that the storage modulus of this actin hydrogel autonomously oscillated for more than ten hours. The oscillatory properties of the actin hydrogels were based on both the treadmilling and gelation by chemical crosslinking of the filamentous actin structures. Thus oscillation can be caused by dynamic instability of actin filament. In this study, I developed simultaneous measurement system both mechanical strength and polymerization of actin, and build a model of oscillating actin gel based on dynamic instability. Additionally, exploring the specific motility of the cytoskeletal protein hydrogel when combined with kinesin linear motor protein.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：アクチン ダイナミックインスタビリティ ナノバイオ

1. 研究開始当初の背景

「創発」とは、生物のように高次の階層性を有する組織体やシステムにおいて、個々の構成要素や、ひとつの階層内だけでは見られない機能が、複数の階層間を跨がることで、はじめて機能発現が誘起される現象のことをいう。生命現象に広く見られる創発機能を実現するためには、高次の階層性を有する組織体の創製が不可欠である。我々は、細胞骨格タンパク質であるアクチンやチューブリンを基本ユニットとし、ポリエチレングリコール鎖などを用いて化学架橋し、ネットワーク化するという手法によって、生体超分子ハイドロゲルの創製に成功している。これらのハイドロゲルは、アクリルアミドの様な一般的な合成高分子ハイドロゲルと異なり、高次の構造次元を有している。すなわち、一般のハイドロゲルは、三次の構造次元を持つのに対して、我々の作製した細胞骨格タンパク質のハイドロゲルは、その基本ユニットとなるタンパク質そのものが生得的に三次の構造次元を持つと考えられることから、アクチンフィラメントなどのタンパク質の繊維状重合体は四次の構造次元を、さらに四次の繊維状重合体間に架橋を導入したハイドロゲルは、五次の構造次元を持つことになる。我々は、このように高次の構造次元を持つ細胞骨格タンパク質のハイドロゲルを、「超高分子階層性ゲル」と名付け、高次の構造次元を有することによって、新奇に発現する機能特性、すなわち「創発機能性材料」の観点から研究をおこなってきた。

2. 研究の目的

本研究では、(1) アクチンゲルの機械強度とアクチンフィラメントの動的構造の同時計測システムを開発し、アクチンの脱重合・重合ダイナミクスと振動現象の関係を明らかにする、(2) 生体内でアクチンフィラメント間を架橋しているアクチン架橋タンパク質を用いてアクチンゲルを作製し、その自己修復能・力学強度の振動現象について検討をおこない、架橋による高次構造化によって惹起された機能発現、すなわち「創発性機能」発現機構について、アクチン分子の動的挙動に立脚した振動現象メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) レオメーターを用いたアクチンゲルの機

械強度と蛍光強度の同時測定系の構築

アクチンゲル (図1) の振動現象は、アクチンフィラメント間の架橋と、アクチンの脱重合・重合ダイナミクスが必須であることが予想された。つまりアクチンゲル中で、アクチンの重合が進んでいるときは、貯蔵弾性率が上昇し、協調的な脱重合が起こることで貯蔵弾性率が低下しているのではないかと考えた。一般に、蛍光色素でラベルしたアクチンでは、フィラメント化に伴い蛍光強度が上昇することが知られていることから、力学強度と蛍光強度を同時にモニターすることで、自励振動中のアクチンの動態が明らかになると考えた。これまでも、アクチンゲルの力学強度の振動は、(ストレス) レオメーターを用いてモニターしている。このとき測定に用いるプレートを石英製にすることで、測定プレート上面に光学系を導入することができる。そこでハードウェア面では、プレート上面からレーザー光を導入、反射光 (蛍光) を分光器や光電子増倍管で検出することを試みた。また、焦点距離の長いレンズを使って蛍光顕微鏡系をワーキングスペースに導入する測定系の構築も併せて試みた。予備実験の結果から、前者の方法が有効であることが分かったため、装置系の改良を進めた。

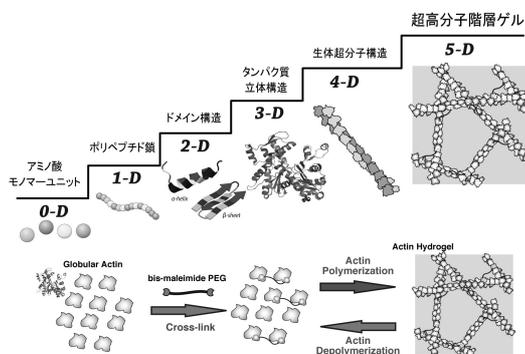


図1. 超高分子階層ゲルの概要

(2) 微小管ゲルへの拡張

ダイナミックインスタビリティは、アクチンより微小管の方が大きいことが知られている。そこで、微小管ゲルでも同様の力学強度の振動が観察できるかどうか検討した。

また微小管ゲルでは、従来の *in vitro* motility assay 法と融合したユニークな方法で、これまでの分子 bioactuator 系では、抽出することができなかった大きな運動を抽出することを試みた。

(3) 細胞生物学的なアクチン挙動の解析モデルとしての粘菌

真正粘菌 *Physarum polycephalum* をモデル生物に、アクチンゲルの自励振動現象を、細胞生物学的なアクチンの挙動と関連づけることができるかどうか検討した。アクチンの制御系を担うタンパク質を *in situ* で発現制御し、アクチンネットワーク、すなわちアクチンゲルの動態解析を行うことを試みた。ここで、タンパク質発現制御法に、線虫で広く用いられている、Feeding RNAi 法が粘菌にも適用できると考えた。

まず最初に、アクチンの動態と深く関連している低分子量 G タンパク質に着目した。低分子量 G タンパク質のひとつである Ras1 遺伝子の cDNA をプラスミド L4440 にクローニングした。また、コントロールとしてヘマグルチニン遺伝子を同様にクローニングし、大腸菌 HT115 (DE3) 株に形質転換した後、二本鎖 RNA の発現を誘導した後、粘菌に捕食させることを試みた。

4. 研究成果

(1) アクチンゲルの機械強度、蛍光強度の同時測定系の開発

力学強度と蛍光強度を同時に測定することができる装置の開発を行った。実際には、同様の測定装置が市販されているが、時間分解能、検出感度とも十分であるとは言えなかった。まず、本研究では、市販品と比較して、時間分解能で 3 倍、検出感度では 100 倍程度の性能を持つものを設計、構築した。このプロトタイプ機の実測では、時間分解能はおよそ 10 秒であり、アクチンゲルの自励振動周期である 15~20 分と比べて充分であるといえる。また、このプロトタイプ機は、周波数が 1Hz、ひずみ量が 1~1000%でも蛍光観察が可能であった。しかしながら検出感度を上げる必要があったため、改良を加えたところ、プロトタイプ機と比較して、時間分解能で 2 倍、検出感度で 20 倍にすることに成功した (図 2)。

試料面では、まずアクチンフィラメントの一分子蛍光観察で実績のある Lys375 に、有機色素の中では退色に強い蛍光色素を結合したものを準備し、実験を行った。しかしながら Lys375 に AlexaFluoro 色素を結合したアクチンでは、重合能が大きく損なわれたことから、PEG 架橋が施されていない Cys374 に

同じく AlexaFluoro 色素を結合させた。こち



図 2. レオメータパラレルプレート上部に導入した光学系

らの分子は、重合に大きな問題は生じなかったことからこれを用いて実験を行った。

しかしながら、このアクチンゲルでは、レーザー光による蛍光の退色が激しく、同時測定は成功していない。また、退色に強いと言われている色素を用いて実験をおこなったが、溶液中とは異なり、ゲル中では退色が速く、未だ測定に成功していない。

(2) 微小管ゲルへの拡張

微小管のダイナミックインスタビリティは、アクチンのものよりも計測や解析が容易と考えられたことから、PEG 架橋した微小管ゲルにおいても自励振動が観察できるか検討した。その結果、PEG 架橋した微小管においても自励振動することを明らかにした。

微小管は、アクチンと異なり温度により重合・脱重合の平衡を変えることができるため、物性評価が比較的容易であることから、この微小管ゲルの基本的な物性評価を行った。その結果、微小管ゲルでは、共有結合性の架橋点の数が増えるに従い、チューブリンの温度依存的な重合の促進が見られた。しかしながら一方で、架橋点の数に比例して、脱重合も促進された。これらの結果は、架橋点の増加、すなわち微小管のゲル化に伴って、ダイナミックインスタビリティが増大していることを示唆する。このことは、細胞骨格タンパク質ゲルの自励振動の分子メカニズムを解明する上で、極めて重要な発見であると考えた。実際に、アクチンゲルの架橋点の数を減少させていき、自励振動に与える影響を調べた。架橋点が減るにつれ、ゲルそのものの貯蔵弾性率は減少し、自励振動の振幅も小さくなっ

た。さらに架橋点を減らすと逆ノコギリ波状の規則正しい周期的な自励振動が消え、不規則なパルス的な貯蔵弾性率の変化が観察された(図3)。

これらの結果から、架橋、すなわちゲル化することで、細胞骨格タンパク質は大きなダイナミックインスタビリティを獲得し、その結果、何らかの同調メカニズムと相まって、一定周期の自励振動が観察されることが明らかになった。この同調メカニズムの解明に向け、非共有結合性のアクチンゲルを作製・検討を進めたが、顕著な成果は得られなかった。

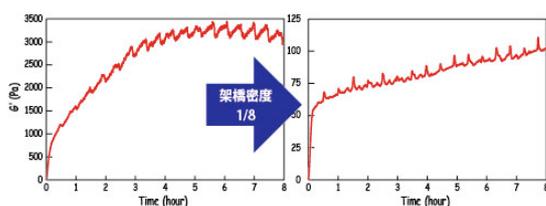


図 3. 架橋密度依存的な貯蔵弾性率の自励振動現象

一方、微小管ゲルが獲得した、より大きなダイナミックインスタビリティに着目し、一般的な *in vitro* motility assay の系に、微小管ゲルを適用させた。カバーガラスにモータータンパク質であるキネシンを固相化し、通常、キネシンによって微小管をスライディングさせる。このとき、微小管の代わりに、PEG 架橋した微小管ゲルを用いたところ、キネシンの運動によって、微小管ゲルが大きく、協調的に運動することが分かった。この系に、ビーズを導入したところ、ビーズは大きく、激しい運動性を示した。このときのビーズの変異量は、従来の *in vitro* motility assay ベースのアクチュエータによる運動能を大幅に上回る (Kawamura et al., 投稿準備中)。

(3) 細胞生物学的なアクチン挙動の解析モデルとしての粘菌

細胞骨格タンパク質ゲルの自励振動現象において、細胞骨格フィラメントの協調的な脱重合が鍵となっている。実際に、アクチンの脱重合阻害剤であるファロイジンをゲルに加えると脱重合が抑制され、自励振動が観られなくなる。しかしながら、協調的な脱重合のメカニズムは未だに分っていない。

そこで、細胞生物学的なアクチン細胞骨格の動的挙動がモデルとして、用いることができるのではないかと考え、真正粘菌を用いて、

アクチン細胞骨格に外部から揺籃を与え、その動的挙動の解析から、協調的脱重合のメカニズムの解明を目指した。

外部から揺籃を与える方法として、Feeding RNAi 法を用いることを計画した。dsRNA を発現する大腸菌をそれぞれ粘菌に餌として与えたところ、粘菌はヘマグルチニン遺伝子を持つ大腸菌を早々に捕食したのに対して、Ras1 遺伝子を持つ大腸菌の積極的な捕食は、24 時間経過後も見られなかった。粘菌はこのとき、変形体の一部は大腸菌に常に接しながらこの大腸菌の周囲を徘徊し、積極的な捕食行動を起こしたいが、何らかの理由でできない、いわば葛藤状態にあるように見えた。また、アクチン細胞骨格御動態は、明らかに影響を受けていることが分かった。さらに、このときの大腸菌を調べたところ、dsRNA だけでなく、Ras1 タンパク質そのものも発現していた。

次に、この現象が RNAi によるものなのか、わずかに発現した Ras1 タンパク質によるものか検討を加えた。dsRNA を発現せず、Ras1 タンパク質を発現するプラスミド、Ras1 遺伝子にナンセンス変異を導入したプラスミドをそれぞれ作製し、大腸菌に形質転換後、粘菌の捕食行動を調べたところ、Ras1 タンパク質が原因であることが分かった。

今回、観察された現象は、粘菌が leading edge において、ウエスタンブロッティングで検出が確認できるレベルの Ras1 タンパク質を発現する大腸菌を捕食することで、アクチンの動態に大きな影響を与えるのだ。現在、この知見を基に、アクチン細胞骨格の動態解析と、モデル化を進めている。このモデルを基に、協調的な脱重合モデルの構築を行うことができるものと期待している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 川村隆三、佐野健一、長田義仁 『細胞骨格トレッドミルマシン - バイオアクチュエータとしての可能性』 設計工学 バイオサイエンスとインダストリー **48**, 11-15 (2013) (査読無)
- ② Sano K., Kawamura R., Tominaga T., Oda N., Ijiri K., Osada Y. “Self-repairing filamentous actin hydrogel with hierarchical structure” *Biomacromolecules*, **12**, 4173-4177 (2011) (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

- ① **Sano K.**, Ichimura M., Arai Y., Nakayama N., Hara M., Aono M. “Slime mold in conflicting” International Symposium on Advanced Soft Materials, 札幌市, Oct. 18, 2013.
- ② **佐野健一**、「生物を倣い、材料から習うナノテクノロジー」精密工学会第 65 回マイクロ/ナノシステム研究専門委員会, 東京都目黒区 (招待講演) 2013 年 10 月 11 日
- ③ **佐野健一**、新井裕太、市村充、中山典久、原正彦、青野真士、「葛藤する真正粘菌とその解析」第 86 回日本生化学会年会, 横浜市, 2013 年 9 月 11 日
- ④ **Sano K.**, Kawamura R., Tominaga T., Osada Y. “Oscillatory property of PEG-Crosslinked Actin Hydrogel”, 福岡市, 2012 年 12 月 14 日
- ⑤ Kawamura R., **Sano K.**, Tominaga T., Oda N., Ijio K., Osada Y. “Microtubule hydrogel and the motility with motor protein” GelSympo2012, つくば市, Oct. 10, 2012.
- ⑥ 川村隆三、**佐野健一**、富永大輝、小田直子、居城邦治、長田義仁、「高次階層構造による微小管ゲルのメカノケミカル効果」第 61 回高分子討論会, 名古屋市, 2012 年 9 月 19 日
- ⑦ **佐野健一**、「生体分子を使った静的な構造構築から動的な構造形成へ」北海道大学電子科学研究所講演会, 札幌市 (招待講演) 2012 年 9 月 10 日
- ⑧ **佐野健一**、「生体分子の分子認識能の利用」つくばソフトマター研究会, 東海村 (招待講演) 2012 年 8 月 30 日
- ⑨ **Sano K.**, Kawamura R., Ijio K., Osada Y. “Stress-responsible cytoskeletal protein hydrogels with high hierarchical structure” International Conference on Biopolymers 2011, 北京 (中国) (招待講演), Oct. 19, 2011.
- ⑩ **佐野健一**、川村隆三、富永大輝、小田直子、居城邦治、長田義仁、「細胞骨格タンパク質の機能材料化」第 60 回高分子学会年会, 大阪市 2011 年 5 月 26 日

[図書] (計 1 件)

- ① **Sano K.**, Kawamura R., Osada Y. “Employing Cytoskeletal Treadmilling in Bio-Actuator” in *Soft Actuators- Materials, Modeling, Applications, and Future*

Perspectives. Springer, 印刷中, 10 pages (2014)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 健一 (SANO, Ken-Ichi)

日本工業大学・工学部・准教授

研究者番号：80321769